

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 6 月 23 日 (23.06.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/056590 A1

(51) 国際特許分類: C07K 14/46, A61K  
48/00, A61P 21/00, G01N 33/15, 33/50

(74) 代理人: 渡邊 薫 (WATANABE, Kaoru); 〒1400001 東京都品川区北品川一丁目11番6号 TYビル6階 薫風国際特許事務所 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/018179

(22) 国際出願日: 2004 年 12 月 7 日 (07.12.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-408744 2003 年 12 月 8 日 (08.12.2003) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関 1 丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP). 長寿医療センター総長 が代表する日本国 (JAPAN AS REPRESENTED BY THE PRESIDENT OF NATIONAL CENTER FOR GERIATRICS AND GERONTOLOGY) [JP/JP]; 〒4748511 愛知県大府市森岡町源吾 3 6-3 Aichi (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL INTERACTION BETWEEN PROTEINS, THERAPEUTIC AGENT FOR DISUSE ATROPHY UTILIZING THE NOVEL INTERACTION, AND METHOD RELATING TO DISUSE ATROPHY

(54) 発明の名称: タンパク質間の新規相互作用及び新規相互作用を利用した廃用性筋萎縮治療剤又は廃用性筋萎縮に係わる方法

(57) Abstract: [PROBLEMS] To provide novel interactions between proteins. [MEANS FOR SOLVING PROBLEMS] A protein interaction between proteasome and ZNF216 (or AWP1) has been found. Also, a protein interaction between polyubiquitin chain and ZNF216 (or AWP1) has been found. Utilizing these novel protein interactions, there are provided a therapeutic agent for disuse atrophy, method of screening a therapeutic agent for disuse atrophy, marker for disease diagnosis, method of onset risk estimation, etc.

(57) 要約: 【課題】 タンパク質間の新規な相互作用の提供。 【解決手段】 プロテアソームと ZNF216 (又は、AWP1) との間にタンパク質間相互作用があることがわかった。また、ポリユビキチン鎖と ZNF216 (又は AWP1) との間にもタンパク質間相互作用があることがわかった。この新規なタンパク質間相互作用を利用して、廃用性筋萎縮の治療剤、及び、廃用性筋萎縮治療剤のスクリーニング方法、疾病診断用マーカー、発症リスク評価方法等を提供する。



WO 2005/056590 A1

## 明 細 書

タンパク質間の新規相互作用及び新規相互作用を利用した廃用性筋萎縮治療剤又は廃用性筋萎縮に係わる方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、タンパク質間の新規な相互作用に関する。また、タンパク質間の新規な相互作用に基づいた廃用性筋萎縮治療剤、及び、廃用性筋萎縮治療剤のスクリーニング方法、疾病診断用マーカー、発症リスク評価方法に関する。

### 背景技術

[0002] ヒトゲノム(全遺伝情報)のDNA塩基配列の解析がほぼ終了し、今後の研究課題は、DNAにコードされる遺伝子の機能を解明するという方向に移ってきている。DNAにコードされる遺伝情報の多くは、タンパク質に関するものであり、タンパク質の構造、機能、役割等を明らかにすることにより、遺伝子の機能を解明しようとする研究が、各研究機関で行われている。

[0003] 生体内では、遺伝情報に基づいて、多くのタンパク質が発現し、それらのタンパク質が相互作用を起こすことにより、生命活動が維持されている。例えば、細胞内の代表的な代謝経路であるクエン酸回路は、複数の酵素(タンパク質)が相互作用することにより、ピルビン酸を分解し、ATP産生のためのエネルギーを供給する。

[0004] また、生体に引き起こされる疾患の多くは、細胞内のタンパク質間の相互作用に異常が生じて、発生すると考えられる。例えば、遺伝性疾患の場合、正常なタンパク質が発現しないため、必要なタンパク質間相互作用が欠損したり、タンパク質間相互作用に異常が生じたりして、代謝異常を起こし、疾患が発生する。

[0005] 従って、生体内で発現する各種タンパク質について、タンパク質間の相互作用を明らかにすることは、細胞内の反応経路を解明したり、各タンパク質の機能や役割を明らかにしたりする上で、重要である。また、タンパク質間の相互作用を明らかにすることにより、各種疾患の発生機序を解明したり、治療剤を開発したりする上で、有効な情報を提供することができる。

[0006] ここで、本発明に関連する4つのタンパク質、プロテアソーム、ユビキチン、ZNF21

6、AWP1について、説明する。

- [0007] プロテアソームは、核及び細胞質に局在する高分子のプロテアーゼ(タンパク質分解酵素)で、28個のサブユニットからなる分子量70〜80万のタンパク質である。プロテアソームの両端にそれぞれPA70(活性化因子)が結合した「26Sプロテアソーム」は、ATP依存的に、タンパク質を分解する機能を持ち、ユビキチン／プロテアソームタンパク質分解系の中心的な役割を担っている。26Sプロテアソームは、ポリユビキチン化(ポリユビキチン鎖によって修飾)されたタンパク質を選択的に分解する(非特許文献1)。
- [0008] また、プロテアソームは、廃用性筋萎縮の発症機序にも関与している(非特許文献2、非特許文献3)。廃用性筋萎縮とは、例えば、寝たきり状態が続く、筋肉を使わない状態が持続する場合に、筋肉の大きさが減少し、筋力低下が起こってくることをいう。筋肉を使わない状態が続くと、ミオシン等の筋肉を構成するタンパク質が、ユビキチン／プロテアソームタンパク質分解系において分解されるため、筋肉の大きさが減少して発症するものと考えられる。
- [0009] ユビキチンは、真核生物に普遍的に存在する、アミノ酸76個からなるタンパク質で、ユビキチン／プロテアソームタンパク質分解系において、分解するタンパク質(標的タンパク質)を標識する役割を持つ。ユビキチン／プロテアソームタンパク質分解系では、ポリユビキチン鎖が標的タンパク質を標識する役割を果たす。ポリユビキチン鎖は、ユビキチンが多数枝状に結合したもので、標的タンパク質の特定部位に結合している。標的タンパク質にポリユビキチン鎖が結合していると、26Sプロテアソームが標的タンパク質を認識して、標的タンパク質を分解する(非特許文献1参照)。
- [0010] ZNF216は、1998年に、D. A. Scotらによって、ジンクフィンガータンパク質として、遺伝子が同定されたタンパク質である(非特許文献4)。また、AWP1は、2000年にW. Duanらによって単離された新規なタンパク質である(非特許文献5)。いずれのタンパク質も、生体内における具体的な機能、役割は、まだわかっていない。
- 非特許文献1:「実験医学」, 羊土社, 2003年2月, 第21巻, 第3号, p. 330-332
- 非特許文献2: Gomes et al“ Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy”, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2000,

Vol.98,No.25,pp14440-14445

非特許文献3: Bodine et al “Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy”, Science, 2001, Vol.294, pp.1704-1708

非特許文献4: D.A.Ccott et al “Identification and mutation analysis of a cochlear-expressed, zinc finger protein gene at the DFNB7/11 and dn hearing-loss-loci on human chromosome 9q and mouse chromosome 19”, AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, Elsevier Science B.V., 1998, p461-469

非特許文献5: W.Duan et al “Cloning and characterization of AWP1, a novel protein that associates with serine/threonine kinase PRK1 in vivo”, AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES, GENOMES AND EVOLUTION, Elsevier Science B.V., 2000, p113-121

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

- [0011] 生体内に発現するタンパク質の多くは、どのタンパク質と相互作用し、どのような機能、役割を担っているのか、未解明なままである。そこで、本発明は、タンパク質間相互作用の網羅的な解析を行うことによって、タンパク質間の新規な相互作用を提供する。また、機能未知のタンパク質と、特定の疾病の発症に関与することが知られているタンパク質と、の相互作用を見出すことにより、その疾患の治療剤を提供する。さらに、この新規な相互作用に基づいて、前記特定疾患に関するスクリーニング方法、診断用マーカー、発症リスク評価方法を提供する。

### 課題を解決するための手段

- [0012] 今回、タンパク質間相互作用に網羅的な解析より、タンパク質分解系において中心的な役割を果たすプロテアソームと、生体内における機能の未知なZNF216(配列番号1からなるタンパク質)又はAWP1(配列番号2からなるタンパク質)との間に、相互作用があることを、新規に見出した。即ち、ZNF216又はAWP1は、プロテアソームと相互作用する性質を有し、プロテアソームは、ZNF216又はAWP1と相互作用する性質を有する。

- [0013] 前記のとおり、プロテアソームは、廃用性筋萎縮の発生機序に関与していることがわかっている。ある個体が寝たきり等の状態になった場合、その個体の生活環境の変化に対応するため、その個体の各細胞内では、様々な細胞内応答が引き起こされていると考えられる。その細胞内応答は、タンパク質間の相互作用によって次々と伝達され、最終的には、プロテアソームとの相互作用によって、筋肉を構成するタンパク質を分解する反応が起きる。従って、ある個体が寝たきり等の状態になった場合に、細胞内応答によって生じる多くのタンパク質間相互作用のうちの、一つのタンパク質間相互作用の結合特性を変化させれば、筋萎縮(プロテアソームによる筋肉構成タンパク質の分解)を止めることができる。
- [0014] そこで、本発明では、プロテアソームと相互作用する性質を有するZNF216又はAWP1の発現を抑制する廃用性筋萎縮治療剤を提供する。ZNF216又はAWP1の発現を抑制することにより、ZNF216又はAWP1とプロテアソームとの間の相互作用による情報伝達が抑えられるため、プロテアソームによる筋肉構成タンパク質の分解が抑制される。従って、筋肉が減少せず、廃用性筋萎縮を予防、治療することができる。
- [0015] ZNF216又はAWP1の発現を抑制する手段として、RNA干渉を応用することができる。RNA干渉(RNA Interference)とは、二本鎖RNAによって、その配列に特異的なmRNAが分解され、その結果、遺伝子の発現が抑制される現象をいい、短いRNA(siRNA、short interfering RNA)を用いることにより、哺乳類にも応用が可能である。
- [0016] 本発明に係る二本鎖RNAは、ZNF216をコードするDNA配列(配列番号3)又はAWP1をコードするDNA配列(配列番号4)の一部分(18〜24塩基)に対応する配列を持つものを用いる。この二本鎖RNAは、短いもの(18〜24塩基)であれば、標的配列(配列番号3又は配列番号4の配列)のどの部分に対応していても、ZNF216又はAWP1の発現をある程度抑制できると考えられるが、二本鎖RNAの作製の際には、TTTT又はAAAAの配列を含まず、RNAの二次構造が開いていると予想される箇所の配列を選ぶ方が、発現を効果的に抑制できるので、より好適である。
- [0017] その他、ZNF216又はAWP1とプロテアソームとの間の相互作用が起きないように

するため、ZNF216又はAWP1自体の機能を阻害又は抑制する廃用性筋疾患用治療剤を用いてもよい。また、ZNF216又はAWP1とプロテアソームの間の相互作用自体を阻害又は抑制することにより、筋萎縮を予防、治療することもできる。

[0018] また、今回、タンパク質分解系において標識の役割をするポリユビキチン鎖と、生体内における機能の未知なZNF216又はAWP1との間にも、相互作用があることがわかった。即ち、ZNF216又はAWP1は、ポリユビキチン鎖と相互作用する性質を有し、ポリユビキチン鎖は、ZNF216又はAWP1と相互作用する性質を有する。

[0019] 廃用性筋萎縮の場合、プロテアソームは、ポリユビキチン鎖の結合している筋肉構成タンパク質を分解していると考えられる。ポリユビキチン鎖は、ZNF216又はAWP1との相互作用によって情報が伝達されて、筋肉構成タンパク質と結合するため、ポリユビキチン鎖とZNF216又はAWP1との間の相互作用が抑制されると、情報伝達が抑制されて、筋肉構成タンパク質との結合が抑制される。また、ポリユビキチン鎖とZNF216又はAWP1との間の相互作用が抑制された場合、情報伝達が阻害されて、ポリユビキチン鎖とプロテアソームとの間の相互作用を抑制することも考えられる。この場合も、プロテアソームによる筋肉構成タンパク質の分解が抑制される。

[0020] そこで、前記と同様に、本発明では、ポリユビキチン鎖と相互作用する性質を有するZNF216又はAWP1の発現を阻害する廃用性筋萎縮治療剤を提供する。ZNF216又はAWP1とポリユビキチン鎖との間の相互作用による情報伝達が行われなくようにするため、ZNF216又はAWP1自体の機能を直接阻害又は抑制する治療剤を用いてもよい。また、ZNF216又はAWP1とポリユビキチン鎖の間の相互作用自体を阻害又は抑制することにより、筋萎縮を予防、治療することもできる。

[0021] 次に、本発明では、廃用性筋萎縮治療剤製造のために、プロテアソームとZNF216又はAWP1との間の相互作用を直接的に又は間接的に使用することができる。

[0022] 例えば、廃用性筋萎縮治療剤製造工程の過程において、前記相互作用を利用したスクリーニング方法を用いて目的の物質を選別し、この物質を廃用性筋萎縮治療剤製造に利用することができる。あるいは、治療剤の候補となる物質が正しく活性を持っているか否かを品質検査する場合に、前記相互作用を利用することができる。その他、この相互作用を、廃用性筋萎縮の疾病診断用マーカーとして利用したり、発症

リスクを評価する手段に応用したりすることもできる。

- [0023] そこで、まず、本発明では、プロテアソームとZNF216又はAWP1との間の相互作用を利用する廃用性筋萎縮治療剤のスクリーニング方法を提供する。本発明に係るスクリーニング方法によって、対象とするタンパク質間の相互作用の結合特性を変化(阻害又は増進)させ得る化合物のスクリーニングを実施することができる。かかる化合物は、対象とするタンパク質間相互作用に関連する疾病(疾患)に対する治療薬又は予防薬の候補となり得る。
- [0024] このようなスクリーニングは、上記相互作用を検出するための反応条件に候補化合物を適切な濃度で添加して、相互作用に対する影響を調べる手法を含む。この手法は、従来の酵素標識免疫吸着アッセイ(ELISA法)と同様の手法としてスクリーニング可能である。そして96ウェルプレート上にプロテアソームあるいはZNF216又はAWP1を結合固定化し、そこにスクリーニング対象分子を添加し、さらにZNF216又はAWP1(ZNF216又はAWP1を固定化した場合はプロテアソーム)、標識抗体、基質の順で反応させ、スクリーニング対象物質が存在下でどのくらいプロテアソームとZNF216又はAWP1との間の結合が変化するかを調べる。基質の発色が強い方が両者の結合は強いことになる。
- [0025] なお、薬物のスクリーニングは、NMR分光光学やX線結晶解析や電子顕微鏡等による一分子直接観察によっても可能である。また表面プラズモン共鳴センサ(SPR)を用いても効率よくスクリーニング可能で、プロテアソームかZNF216のいずれかをやはりSPRのセンサーチップ上に固定化し、スクリーニング対象分子を添加したZNF216又はAWP1(ZNF216又はAWP1を固定化した場合はプロテアソーム)をセンサーチップ上に送液する。両者の結合は表面プラズモン共鳴によりリアルタイムに結合曲線が観察され、両者の結合が強まれば結合曲線は増高し、弱まれば減弱あるいは消失する。
- [0026] また、本発明では、ZNF216又はAWP1又は該タンパク質をコードする遺伝子からなる廃用性筋萎縮用の疾病予防、診断用マーカーを提供する。
- [0027] ZNF216又はAWP1が、廃用性筋萎縮に関与することが明らかであるプロテアソームと相互作用を示すという、本願発明者らの鋭意研究の結果によって得られた全く

の新知見に基づいて、ZNF216又はAWP1、又はこのタンパク質をコードする遺伝子は廃用性筋疾患の発症に関与することが判明した。このことから、ZNF216又はAWP1の発現状態や、このタンパク質をコードする遺伝子の変異(一塩基多型等)を調べることによって、廃用性筋疾患の診断に役立てることができる。即ち、ZNF216又はAWP1をコードする遺伝子は、廃用性筋疾患診断用マーカーとなる。

[0028] さらに、本発明では、ZNF216又はAWP1、又はこのタンパク質をコードする遺伝子を用いる廃用性筋疾患の発症リスク評価方法を提供する。

[0029] 廃用性筋疾患にプロテアソームを介して関与することがわかったZNF216又はAWP1の発現状態を調べたり、このタンパク質のコードする遺伝子の変異や一塩基多型等を調べたりすることによって、将来に例えば寝たきり等になった場合の廃用性筋疾患の発症リスク評価を行うことができる。

[0030] 続いて、上述したプロテアソームとZNF216又はAWP1との間の相互作用を利用する場合と同様に、本発明では、廃用性筋萎縮治療剤製造のために、ポリユビキチン鎖とZNF216又はAWP1との間の相互作用を直接的に又は間接的に使用することもできる。

[0031] 例えば、廃用性筋萎縮治療剤製造工程の過程において、前記相互作用を応用したスクリーニング方法を用いて目的の物質を選別し、この物質を廃用性筋萎縮治療剤製造に利用することができる。あるいは、治療剤の候補となる物質が正しく活性を持っているか否かを品質検査する場合に、前記相互作用を利用することができる。その他、この相互作用を、廃用性筋萎縮の疾病診断用マーカーとして利用したり、発症リスクを評価する手段に応用したりすることもできる。

[0032] そこで、まず、本発明では、ポリユビキチン鎖とZNF216又はAWP1との間の相互作用を利用する廃用性筋萎縮治療剤のスクリーニング方法についても提供する。上述したプロテアソームとZNF216又はAWP1との間の相互作用を利用する場合と同様に、本発明に係るスクリーニング方法によって、対象とするタンパク質間の相互作用の結合特性を変化(阻害又は増進)させ得る化合物のスクリーニングを実施することができる。かかる化合物は、対象とするタンパク質間相互作用が関連する疾病(疾患)に対する治療薬又は予防薬の候補となり得る。



- [0033] また、本発明では、ZNF216又はAWP1、又は該タンパク質をコードする遺伝子からなる廃用性筋萎縮用の疾病予防、診断用マーカーを提供する。
- [0034] 即ち、ZNF216又はAWP1が、廃用性筋萎縮に関与することが明らかであるポリユビキチン鎖と相互作用を示すという、本願発明者らの鋭意研究の結果によって得られた全くの新知見に基づいて、ZNF216又はAWP1、又はこのタンパク質をコードする遺伝子は廃用性筋疾患の発症に関与することが判明した。このことから、上述したプロテアソームとZNF216又はAWP1との間の相互作用を利用する場合と同様に、ZNF216又はAWP1の発現状態や、このタンパク質をコードする遺伝子の変異（一塩基多型等）を調べることによって、廃用性筋疾患の診断に役立てることができる。即ち、ZNF216又はAWP1をコードする遺伝子は、廃用性筋疾患診断用マーカーとなる。
- [0035] さらに、本発明では、上述したプロテアソームとZNF216又はAWP1との間の相互作用を利用する場合と同様に、ZNF216又はAWP1、又はこのタンパク質をコードする遺伝子を用いる廃用性筋疾患の発症リスク評価方法を提供する。
- [0036] 廃用性筋疾患にポリユビキチン鎖を介して関与することがわかったZNF216又はAWP1の発現状態を調べたり、このタンパク質のコードする遺伝子の変異や一塩基多型等を調べたりすることによって、将来に例えば寝たきり等になった場合の廃用性筋疾患の発症リスク評価を行うことができる。
- [0037] なお、本発明におけるZNF216及びAWP1は、配列表の配列番号1及び配列番号2にそれぞれ示されたアミノ酸配列を有するタンパク質それ自体のみに狭く限定されるのではなく、プロテアソーム又はポリユビキチン鎖との間に相互作用があり、前記のアミノ酸配列の一部のアミノ酸が欠失、置換、付加あるいは挿入されたタンパク質である場合も含むものとする。また、本発明におけるZNF216及びAWP1をコードするcDNAの塩基配列を、配列番号3及び配列番号4にそれぞれ示したが、この塩基配列についても、前記の相互作用を失わないものであって、塩基配列の一部が欠失、置換、付加あるいは挿入されたものを含むものとし、コードするタンパク質それ自体のみに狭く限定されない。
- [0038] 以上のように、廃用性筋萎縮に関与するタンパク質として知られているプロテアソー

ムが、ZNF216(又はAWP1)と相互作用することが明らかになった結果、本発明は、この相互作用並びにZNF216(又はAWP1)又は該タンパク質をコードする遺伝子が、廃用性筋萎縮向けの医薬の創薬技術、診断技術、検査技術、発症リスクの評価技術等に役立つという技術的意義を有する。また、プロテアソームのタンパク質分解系に関与するポリユビキチン鎖が、ZNF216(又はAWP1)と相互作用することが明らかになった結果、本発明は、この相互作用並びにZNF216(又はAWP1)又は該タンパク質をコードする遺伝子が、廃用性筋萎縮向けの医薬の創薬技術、診断技術、検査技術、発症リスクの評価技術等に特に役立つという技術的意義も有する。

### 発明の効果

- [0039] 本発明によって、プロテアソームとZNF216(又はAWP1)の2つのタンパク質の間に、相互作用があることが明らかになった。また、ポリユビキチン鎖とZNF216(又はAWP1)の間にも、相互作用があることが明らかになった。この、新規に見出されたタンパク質間相互作用に関する知見を利用することにより、廃用性筋萎縮治療剤を提供することができる。また、本発明で明らかになった新規の相互作用は、廃用性筋萎縮に関する創薬、診断、検査、発症リスクの評価等に特に有用である。

### 実施例 1

- [0040] 本願発明者らは、ZNF216(配列番号1に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質)及びAWP1(配列番号2に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質)を認識して、相互作用を示す「パートナータンパク質」を、以下の方法によって効率的に探索した。
- [0041] ZNF216(及びAWP1)は、RT-PCR法を用いて、このタンパク質をコードするcDNAを準備した。そして、ZNF216(又はAWP1)をコードするcDNAを、pcDNA-FLAG(プラスミド)に制限酵素的に組み込み、発現ベクターを作製した。pcDNA-FLAGは、ZNF216(又はAWP1)が発現する際に、N末端側に翻訳開始メチオニン残基に続きFLAG認識配列が配列されるように、本願発明者がpcDNA3(プラスミド、Invitrogen社)を元に独自に改変したものである。そして、ZNF216(又はAWP1)をコードするcDNAをpcDNA-FLAGに組み込む時には、制限酵素処理をする際に、ZNF216(又はAWP1)の翻訳開始メチオニンも切断して、翻訳開始メチオニン

をコードする配列を除いたZNF216(又はAWP1)をコードするcDNAを、pcDNA-FLAG(プラスミド)に導入するようにした。なお、「FLAG認識配列」とは、アミノ酸配列「DYKDDDDK」のことをいい、このアミノ酸配列を目的のタンパク質(本実験ではZNF216又はAWP1)の末端配列にあらかじめ組み込んでおくことにより、FLAG認識配列が、その目的タンパク質を認識するためのタグ(標識)として機能する。

- [0042] 続いて、ZNF216遺伝子(又はAWP1遺伝子)が組み込まれた、FLAG認識配列の付いた発現ベクター(組換えpcDNA-FLAG)を培養細胞に導入した(トランスフェクション)。遺伝子導入する培養細胞はHEK293T細胞、トランスフェクション試薬はキアゲン(株)のPolyFectを用いた。遺伝子導入の手順は同製品のプロトコールに従った。
- [0043] トランスフェクションした培養細胞内では、タグが融合した組換えタンパク質が発現する。そして、発現した一部組換えZNF216(又はAWP1)は、細胞内に存在する未知のパートナータンパク質と相互作用し複合体を形成する。そして、ZNF216(又はAWP1)と未知パートナータンパク質との複合体を、ZNF216(又はAWP1)に付したタグに対する抗体を用いた公知の「免疫沈降法」によって、細胞内から抽出した。
- [0044] 抽出方法は、次の通りである。遺伝子導入した細胞を可溶化バッファー(20mM HEPES, pH7.5, 150mM NaCl, 50mM NaF, 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1mM MPMSF, 1% Triton X100)を用いて可溶化した。この可溶化バッファーを加えたのち細胞を掻き取り、遠心管に回収し超遠心(55,000回転, 4°C, 20分)した。
- [0045] 遠心後の細胞抽出液(上清)にFLAGペプチド抗体を固定化したアガロースビーズ(SIGMA社から購入)を加え4°Cで3時間攪拌した。攪拌後のビーズを遠心(1,000回転, 4°C, 1分)して集め可溶化バッファーで洗浄後、FLAGペプチドを含むバッファーを加えることによりビーズに結合したZNF216(AWP1)を溶出し、ZNF216(AWP1)と目的のパートナータンパク質が結合したタンパク質複合体を回収した。
- [0046] タンパク質複合体の回収後は、相互作用の相手となるタンパク質を、公知のタンデム質量計(MS/MS)を用いる「質量タグ法」と称される公知の方法(羊土社「プロテオーム解析法」、磯辺俊明、高橋信弘編、P129-P142)によって同定した。具体的な

手順は以下の通りである。

- [0047] まず、回収したサンプルを、遠心濃縮後、酵素反应用バッファー(100mM Tris, pH 8.8)に溶解した。次に、特定のアミノ酸を認識し切断する酵素である「トリプシン」あるいは「リジルエンドペプチダーゼ」により消化分解した。なお、本実験では、リジルエンドペプチダーゼを用いた。酵素基質比(重量比)が1/100から1/50になるようにリジルエンドペプチダーゼを加え37℃で12時間反応させ、消化物を得た。そして、その消化物をタンデム質量計で測定し、分解された各ペプチドの質量値と内部アミノ酸配列情報を得た。
- [0048] 酵素消化されたペプチド断片の質量値を用いて、データベース上から候補アミノ酸シーケンスを自動検索して選び出し、かつその配列が各アミノ酸でフラグメント化したときの質量値セットを計算した。
- [0049] なお、前記データベースは、既に公開されているタンパク質データベースである「SwissProt」(インターネットアドレス:  
[ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/sp\\_tr\\_nrdb/fasta/sprot.fas.Z](ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/sp_tr_nrdb/fasta/sprot.fas.Z))と核酸データベースである「NCBI RefSeq」(インターネットアドレス:  
[ftp.ncbi.nih.gov/refseq/H\\_sapiens/mRNA\\_Prot/hs.faa.gz](ftp.ncbi.nih.gov/refseq/H_sapiens/mRNA_Prot/hs.faa.gz))を使用した。
- [0050] この計算値と実測のフラグメントイオン(MS/MSスペクトラム)を比較することによって、ZNF216及びAWP1のパートナータンパク質を同定したところ、両方とも、「プロテアソーム」を構成するタンパク質群であることが判明した。これにより、ZNF216又はAWP1とプロテアソームは相互反応を示すことが明らかになった。また、「ポリユビキチン鎖」についても、ZNF216及びAWP1のパートナータンパク質として同定された。これにより、ZNF216又はAWP1とポリユビキチン鎖の間にも相互反応があることが明らかになった。

## 実施例 2

- [0051] 実施例2では、GST(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)を用いて、ポリユビキチン鎖とZNF216又はAWP1との間に相互作用があることを確認する実験を行った。
- [0052] まず、ZNF216とGSTとの融合タンパク質を、遺伝子工学的に大腸菌で生産した。そして、その融合タンパク質をグルタチオンカラム(グルタチオンセファロースビーズ)

を使って、精製した。カラム内では、GSTとグルタチオンが特異的に結合するため、GSTと融合したZNF216のみが、カラム内で捕捉される。その捕捉された融合タンパク質を、溶出バッファーを用いて回収した。

[0053] 次に、回収したZNF216とGSTとの融合タンパク質とポリユビキチン鎖を混合し、混合した溶液を、再び、グルタチオンカラムを使って、精製し、溶出バッファーを用いて回収した。

[0054] 回収した溶液には、GSTと融合したZNF216とともに、ポリユビキチン鎖も回収された。このことは、ZNF216とポリユビキチン鎖が結合親和性を有し、相互作用することを示している。

[0055] また、AWP1とGSTとの融合タンパク質を、前記と同様に生産し、同様に、相互作用があることを確認する実験を行った。その結果、AWP1とポリユビキチン鎖は、ZNF216と同様に、結合親和性があり、相互作用することが示された。

### 実施例 3

[0056] 実施例3は、筋萎縮とZNF216との間に関連性があることを示す実験である。

[0057] マウスの坐骨神経を切除した筋萎縮モデルマウスと、マウスを絶食させることにより筋萎縮を起こした絶食誘導性筋萎縮モデルマウスを用意した。そして、これらのマウスで筋萎縮が見られる骨格筋組織におけるZNF216をコードする遺伝子のmRNA量と、同組織におけるZNF216タンパク質の発現量を測定した。その結果、筋萎縮を起こしたマウスでは、ZNF216をコードする遺伝子のmRNA量及びZNF216タンパク質発現量が顕著に増加した。このことは、筋萎縮が起こる機序において、ZNF216が関与していることを示している。

### 実施例 4

[0058] 実施例4では、RNA干渉を応用し、配列番号5に示された塩基配列を有する二本鎖RNAを用いて、AWP1(配列番号2に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質)の発現を抑制する実験を行った。

[0059] この実験では、(1)配列番号5に示した配列を設計してDNAを合成し、(2)制限酵素とライゲーション反応により、配列番号5に対応するDNAをプラスミドベクターに組み込み、(3)トランスフェクションにより、そのプラスミドベクターからウイルスベクター(

レトロウイルス)を作製し、(4)標的細胞(マウス培養細胞)へその組換えウイルスを感染させて、(5)RNA干渉の効果を判定する、という方法を用いた(羊土社「RNAi実験プロトコル」、多比良和誠ら編、P116〜P128を参照)。具体的な手順は、以下の通りである。

[0060] 配列番号5の配列は、次のように設計されている。最初の「GGATCC」配列は、プラスミドベクターに導入する際に、制限酵素(今回の設計ではBamH1)によって切断される部位である。次の「ATGGCATGTGTTCAGTATG」配列(19塩基)は、センス鎖であり、AWP1をコードする塩基配列の一部分に対応した配列である。次の、「TTCAAGAGA」配列は、リンカー配列であり、センス鎖と後述のアンチセンス鎖が二本鎖を形成した時に、ヘアピン状にカーブして、ステム＝ループ構造を形成させるために設計された配列である。続く「CATACTGAACACATGCCAT」配列(19塩基)は、アンチセンス鎖であり、前記のセンス鎖と相補的になっている。次の「TTTTT」配列は、ターミネーター配列(mRNA転写終結部分)で、後に、組換えレトロウイルスの3'末端のLTR(繰り返し配列)にあるH1プロモーターの配列の部分から、このターミネーター配列の部分までが、RNAポリメラーゼ3によって転写され、目的のmRNAが発現する。最後の「GTCGAC」配列も、プラスミドベクターに導入する際に、制限酵素(今回の設計ではSal1)によって切断される部位である。後に、二本鎖RNAが合成される際には、センス鎖とアンチセンス鎖が相補的に結合して、二本鎖が形成され、リンカー配列の部分は、ヘアピン状にカーブして、センス鎖とアンチセンス鎖が結合できるようにする。以上のように、配列番号5の配列を設計し、配列番号5の配列を持つDNA(オリゴヌクレオチド)を合成した。

[0061] 次に、本実験では、合成したDNAを制限酵素とライゲーション反応を用いてプラスミドベクターに組み込んだ。プラスミドベクターは、本願発明者が独自に作製したもので、組換えレトロウイルスをコードする配列があらかじめ組み込まれたものである。組換えレトロウイルスをコードする配列は、レトロウイルスから逆転写されたcDNA配列と同じ配列のもので、そのうち、ウイルスの感染から宿主細胞のDNAに組み込まれるまでに必要な遺伝子はそのままだし、ウイルスゲノムの発現やウイルスタンパク質の発現に関与する配列部分は除去した配列を有している。また、この組換えレトロウイルス

をコードする配列には、薬剤(puromycin)耐性遺伝子の発現ユニットを挿入しており、ウイルス感染細胞のみをpuromycin処理により選択できる設計となっている。そして、組換えレトロウイルスをコードする配列のうち、3'LTR配列の中に、H1プロモーター配列と、それに続く、二箇所の制限酵素によって切断される配列の部分(今回の設計では、Bgl2とSal1)がある。なお、Bgl2は、BamH1と切断端が一致する制限酵素である。

[0062] 合成したDNAをプラスミドベクターに組み込む際には、合成DNAの制限酵素の切断部位とプラスミドのクローニングサイトを、それぞれ二種類の制限酵素で二箇所切断した後、ライゲーションキットを用いて合成DNAとプラスミドベクターを結合させた。なお、今回の実験では、合成DNAは、BamH1とSal1で、プラスミドは、Bgl2とSal1で、それぞれ切断した。BamH1とBgl2は、切断端が同じなので、合成DNAのBamH1切断部位とプラスミドのBgl2の切断部位、合成DNAのSal1切断部位とプラスミドのSal1切断部位を、それぞれ連結反応(ライゲーション)させて、合成DNAをプラスミドに組み込んだ。そして、合成DNAを組み込んだプラスミドベクターを、コンピテント細胞を用いてサブクローニングしたのち、クローン化した組換えプラスミドベクターを精製した。

[0063] 次に、前記の手順で精製した組換えプラスミドベクターを、培養細胞にトランスフェクションして、組換えレトロウイルスを作製した。ここで、組換えプラスミドベクターには組換えレトロウイルスをコードする配列が含まれているが、この配列には、レトロウイルスが完成し、細胞外に放出するために必要な遺伝子がすべてあらかじめ除去されているため、組換えレトロウイルスは産生されない。そこで、トランスフェクションに際しては、レトロウイルスの完成に必要なタンパク質をコードする遺伝子をあらかじめ組み込んだプラスミドも同時にトランスフェクションして、培養細胞内で、組換えレトロウイルスが完成し、細胞外に放出されるようにした。そして、培養細胞の外に放出された、合成DNAの配列が組み込まれた組換えレトロウイルスを回収した。

[0064] そして、マウス培養細胞に組換えレトロウイルスを感染させた。この組換えレトロウイルスは、感染後、逆転写されてcDNAが合成され、そのcDNAが宿主細胞のDNA配列の中に組み込まれるが、レトロウイルスの発現に必要な配列は除去してあるため

、レトロウイルスは発現しない。そして、宿主細胞に組み込まれた配列のうち、H1プロモーター配列からその転写終結配列の部分までが、宿主細胞にあるRNAポリメラーゼ3の作用により転写される。以上の手順により、合成RNAが安定的に発現するマウス培養細胞を作製した。なお、この合成RNAは、宿主細胞内でリンカー配列が除去される等の修飾を受け、RNA干渉をおこす二本鎖RNAとなる。この二本鎖RNAが、マウス培養細胞内にあることにより、対応するmRNAが特異的に分解され、対応するタンパク質の発現を阻害する。

[0065] 二本鎖RNAによって、RNA干渉が引き起こされているかどうかの判定は、AWP1をコードするmRNAに対するノーザンブロット法によって行った。組換えレトロウイルスが感染したマウス培養細胞からRNAを抽出し、AWP1をコードするmRNAの発現量を調べた結果、AWP1の発現が抑えられていることがわかった。

[0066] 以上の結果から、RNA干渉を応用することにより、AWP1の発現を抑制できることがわかった。AWP1の発現が抑制されることにより、AWP1とプロテアソームとの相互作用、又は、AWP1とポリユビキチン鎖との相互作用が抑えられる。これらの相互作用が抑えられることによって、ある個体が寝たきりなどの長期臥床、神経麻痺、四肢の長期固定、宇宙環境に長期間滞在することなどにより筋肉への付加が著しく低下した状態で発症する廃用性筋萎縮、等になっている場合にも、その情報がプロテアソームに伝達されないため、プロテアソームによる筋肉構成タンパク質の分解はおこらない。従って、RNA干渉を応用した二本鎖RNAは、廃用性筋萎縮の治療剤として有効である。

[0067] なお、この実施例は、RNA干渉を応用した二本鎖RNAが、廃用性筋萎縮治療剤として有効であることを示した実施例の一つに過ぎず、この実施例に狭く限定されない。特に、実験の方法や手段、及び、RNA干渉に用いる二本鎖RNAの配列部位の選択について、狭く限定されない。



### 請求の範囲

- [1] プロテアソームと相互作用する性質を有することを特徴とする配列番号1又は配列番号2からなるタンパク質。
- [2] ポリユビキチン鎖と相互作用する性質を有することを特徴とする配列番号1又は配列番号2からなるタンパク質。
- [3] 配列番号1又は配列番号2からなるタンパク質の発現又は機能を抑制することを特徴とする廃用性筋萎縮治療剤。
- [4] 配列番号1又は配列番号2からなるタンパク質とプロテアソームとの相互作用を抑制することを特徴とする廃用性筋萎縮治療剤。
- [5] 配列番号1又は配列番号2からなるタンパク質とポリユビキチン鎖の相互作用を抑制することを特徴とする廃用性筋萎縮治療剤。
- [6] 廃用性筋萎縮治療剤製造のための、配列番号1又は配列番号2からなるタンパク質とプロテアソームとの間の相互作用の使用。
- [7] 配列番号1又は配列番号2からなるタンパク質とプロテアソームとの間の相互作用を利用することを特徴とする廃用性筋萎縮治療剤のスクリーニング方法。
- [8] 配列番号1又は配列番号2からなるタンパク質とプロテアソームとの間の相互作用を利用することを特徴とする廃用性筋萎縮の疾病診断用マーカー。
- [9] 配列番号1又は配列番号2からなるタンパク質とプロテアソームとの間の相互作用を利用することを特徴とする廃用性筋萎縮の発症リスク評価方法。
- [10] 廃用性筋萎縮治療剤製造のための、配列番号1又は配列番号2からなるタンパク質とポリユビキチン鎖との間の相互作用の使用。
- [11] 配列番号1又は配列番号2からなるタンパク質とポリユビキチン鎖との間の相互作用を利用することを特徴とする廃用性筋萎縮治療剤のスクリーニング方法。
- [12] 配列番号1又は配列番号2からなるタンパク質とポリユビキチン鎖との間の相互作用を利用することを特徴とする廃用性筋萎縮の疾病診断用マーカー。
- [13] 配列番号1又は配列番号2からなるタンパク質とポリユビキチン鎖との間の相互作用を利用することを特徴とする廃用性筋萎縮の発症リスク評価方法。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018179

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> C07K14/46, A61K48/00, A61P21/00, G01N33/15, G01N33/50		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> C07K14/46, A61K48/00, A61P21/00, G01N33/15, G01N33/50		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), JSTPlus (JOIS)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2002-502242 A (Incyte Pharmacetricals, Inc.), 22 January, 2002 (22.01.02), Claim 19; sequence No. 3 & US 5817494 A & WO 1998/053079 A1 & EP 986646 A1	2 3, 5, 10-13
Y	GOMES M.D. et al., Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy, Proc.Natl.Acad.Sci.USA., Vol.98, No.25, 2001, pages 14440 to 14445	3, 5, 10-13
Y	BODINE S.C. et al., Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy, Science, Vol.294, 2001, pages 1704 to 1708	3, 5, 10-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 February, 2005 (15.02.05)		Date of mailing of the international search report 08 March, 2005 (08.03.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018179

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCOTT D.A. et al., Identification and mutation analysis of a cochlear-expressed, zinc finger protein gene at the DFNB7/11 and dn hearing-loss-loci on human chromosome 9q and mouse chromosome 19, GENE, Vol.215, 1998, pages 461 to 469	1, 4, 6-9
A	DUAN Wei et al., Cloning and characterization of AWPl, a novel protein that associates with serine-threonine kinase PRK1 in vivo, GENE, Vol.256, 2000, pages 113 to 121	1, 4, 6-9

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> C07K14/46, A61K48/00, A61P21/00, G01N33/15, G01N33/50

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> C07K14/46, A61K48/00, A61P21/00, G01N33/15, G01N33/50

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)  
 BIOSIS (STN)  
 JSTPlus (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 2002-502242 A (インサイト・ファーマスーティカルズ・インコーポレイ テッド) 2002. 01. 22, クレーム19、配列番号: 3 & US 5817494 A & WO 1998/053079 A1 & EP 986646 A1	2 3、5、10 -13
Y	GOMES M. D. et al., Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 98, No. 25, 2001, pages14440-14445	3、5、10 -13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 02. 2005

国際調査報告の発送日

08. 3. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

植原 克典

4B

9840

電話番号 03-3581-1101 内線 3446

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (2004年1月)